

Use of specified enzymes, especially lysyl oxidase, as protein crosslinking agents for formulating compositions containing active ingredients

Publication number: DE19840489 (A1)

Publication date: 2000-03-09

Inventor(s): FRIEDRICH THOMAS [DE]; BEWERT WOLFGANG [DE]; LUEDDECKE ERIK [DE]; KLINGLER JUERGEN [DE]; HEGER ROBERT [DE] ;

Applicant(s): BASF AG [DE] *

Classification:

- international: A23K1/00; A23K1/16; A23K1/165; A23L1/00; A23L1/302; A23P1/04; A61K9/16; C12N9/06; A23B5/00; A23K1/00; A23K1/16; A23K1/165; A23L1/00; A23L1/302; A23P1/04; A61K9/16; C12N9/06; A23B5/00; (IPC1-7): A23K1/16; A23L1/30; A61K31/07; A61K31/366; A61K31/592; C07K7/08

- European: A23K1/00B3; A23K1/165B; A23K1/16B; A23K1/16C; A23L1/00P4; A23L1/302; A23P1/04; A61K31/16H5H; A61K9/16H6; C12N9/06

Application number: DE19981040489 19980904

Priority number(s): DE19981040489 19980904

Abstract of DE 19840489 (A1)

An enzyme (I) selected from lipxygenases, protein disulfide isomerases, phenol oxidases and peroxidases, lysyl oxidases, protein disulfide reductases, tyrosine oxidases or sulphydryl oxidases is used to formulate compositions containing active ingredients. Independent claims are also included for the following: (1) a process for producing compositions in which one or more active ingredients are surrounded by at least one layer, where at least part of at least one layer comprises a protein that has been crosslinked with (I); (2) a composition in which at least part of at least one layer surrounding one or more active ingredients comprises a protein that has been crosslinked with (I); (3) an isolated protein comprising at least one of amino acid sequences (I)-(XIII): (a) G(S)C(Q)C(K)TNEKVNIAPKPN(C)DT (L)(S) (b) EYPCJAPDVYNTK (c) GQTSYTVQNPNTLR (d) DYNMPCGGXVHR (e) ATGGTYSTVXAQN (f) APETENNAR (g) GPLP(V)NE(E)TTIEPLSFYNT (h) IYELSLQELIAEYGGDDPNNGHTFYSDI (i) DNVDLSCTIQR (j) VAPETENCAR (k) NYDVEYPCAPGVVYNTK (l) GYPNAEY(S)LDIER, in which lysine keta -amino groups are optionally oxidized to aldehyde groups; and (4) a food or animal feed containing the composition of (2).

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide



① BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

Offenlegungsschrift DE 198 40 489 A 1

②1 Aktenzeichen: 198 40 489.1
②2 Anmeldetag: 4. 9. 1998
②3 Offenlegungstag: 9. 3. 2000

②4 Int. Cl.⁷:
C 07 K 7/08
A 61 K 31/07
A 61 K 31/592
A 61 K 31/366
A 23 L 1/30
A 23 K 1/16

DE 198 40 489 A 1

②5 Anmelder:
BASF AG, 67063 Ludwigshafen, DE

②6 Erfinder:
Friedrich, Thomas, Dr., 64283 Darmstadt, DE;
Bewert, Wolfgang, Dr., 67227 Frankenthal, DE;
Lüddecke, Erik, Dr., 67112 Mutterstadt, DE; Klingler,
Jürgen, Dr., 67112 Mutterstadt, DE; Heger, Robert,
Dr., 69124 Heidelberg, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

②7 Wirkstoffzubereitungen sowie ein Verfahren zu deren Herstellung

②8 Die vorliegende Erfindung betrifft Wirkstoffzubereitungen, bei denen ein oder mehrere Wirkstoffe von mindestens einer Schicht oder Teile einer Schicht aus einem Protein umgeben sind, das mit einem Enzym, ausgewählt aus der Gruppe der Lipoxigenasen, Proteinisulfidomerasen, Phenoloxidasen, Lysyloxidasen, Proteinisulfidreduktasen oder Sulfhydryloxidasen, quervernetzt wurde.

Außerdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Wirkstoffzubereitungen, in denen ein oder mehrere Wirkstoffe von mindestens einer Schicht umgeben sind, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der den oder die Wirkstoffe umgebenden Schichten oder Teile dieser Schichten aus einem Protein bestehen, das mit einem Enzym, ausgewählt aus der Gruppe der Lipoxigenasen, Proteinisulfidomerasen, Phenoloxidasen, Lysyloxidasen, Proteinisulfidreduktasen oder Sulfhydryloxidasen, quervernetzt wurde sowie die Verwendung der genannten Enzyme zur Formulierung von Wirkstoffen.

Weiterhin betrifft die Erfindung Lebensmittel, Futtermittel oder pharmazeutische Zubereitungen, enthaltend die erfindungsgemäße Wirkstoffzubereitung sowie das Enzym Lysyloxidase. Im Besonderen betrifft die Erfindung Trockenpulver, die Vitamine, Enzyme, Lebensmittel- und Futtermittelzusatzstoffe, wie z. B. Carotinoide, enthalten. Außerdem können noch verschiedene Zusatzstoffe eingebettet sein.

DE 198 40 489 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Wirkstoffzubereitungen, bei denen ein oder mehrere Wirkstoffe von mindestens einer Schicht oder Teilen einer Schicht aus einem Protein umgeben sind, das mit einem Enzym ausgewählt aus der Gruppe der Lipoxygenasen, Proteindisulfidomerasen, Phenoloxidasen, Lysyloxidasen, Proteinisulfidreduktasen, Tyrosinoxidasen oder Sulfhydryloxidasen quervernetzt wurde.

Außerdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Wirkstoffzubereitungen, in denen ein oder mehrere Wirkstoffe von mindestens einer Schicht umgeben sind, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der den oder die Wirkstoffe umgebenden Schichten oder Teile dieser Schichten aus einem Protein bestehen, das mit einem Enzym ausgewählt aus der Gruppe der Lipoxygenasen, Proteindisulfidomerasen, Phenoloxidasen, Lysyloxidasen, Proteindisulfidreduktasen, Tyrosinoxidasen oder Sulfhydryloxidasen quervernetzt wurde sowie die Verwendung der genannten Proteine zur Formulierung von Wirkstoffen.

Weiterhin betrifft die Erfindung Lebensmittel, Futtermittel oder pharmazeutische Zubereitungen enthaltend die erfindungsgemäße Wirkstoffzubereitung sowie das Enzym Lysyloxidase. Im Besonderen betrifft die Erfindung Trockenpulver, die Vitamine, Enzyme, Lebensmittel- und Futtermittelzusatzstoffe, wie z. B. Carotinoide enthalten. Außerdem können gegebenenfalls noch verschiedene Zusatzstoffe eingebeutet sein.

Pulverförmige Wirkstoffzubereitungen wie Vitamin- und Carotinoid-Präparate sind allgemein bekannt und werden in der pharmazeutischen Industrie sowie in der Nahrungs- und Futtermittelindustrie in großem Umfang verwendet. In der Literatur werden viele Verfahren zur Herstellung geeigneter Präparate beschrieben.

Zur Herstellung von pulverförmigen Zubereitungen, in denen oxidationsempfindliche Stoffe wie lösliche Vitamine oder Carotinoide gegen oxidative Einflüsse geschützt werden sollen, werden verschiedene Herstellungsverfahren, insbesondere Sprühverfahren beschrieben.

In der deutschen Patentschrift 10 35 319 wird beschrieben, wie eine Dispersion eines öligen Vitamins in einem hohen Überschuß von pulverförmiger Stärke mit einem geringen Feuchtigkeitsgehalt (unter 8%) versprüht wird. Durch das trockene Stärkepulver wird den versprühten Partikeln Wasser entzogen. Hierdurch erstarrten sie, wobei eine große Menge der Stärke an der Oberfläche der Partikel haften bleibt. Außerdem muß der überschüssige Stärkeanteil abgetrennt und anschließend wieder dem Prozeß zugeführt werden.

In der schweizerischen Patentschrift 488 455 wird dargelegt, daß als Puderungsmittel ein Gemisch aus anorganischen Substanzen eingesetzt wird, das aus wasserabweisenden und wasserabsorbierenden Substanzen besteht. Hierdurch soll die Explosionsgefahr, die durch die trockene, feinteilige Stärke besteht, vermindert werden.

Aus der schweizerischen Patentschrift 389 505 ist bekannt, daß die Dispersion des Wirkstoffs in ein gekühltes, gasförmiges Medium versprüht wird, in dem die versprühten Partikel durch Abkühlung erstarren. Für diesen Prozeß werden Fallhöhen von bis zu 15 m benötigt, außerdem müssen die Temperaturen deutlich unter Raumtemperatur gehalten werden.

Eine weitere Methode zur Verfestigung der versprühten Partikel kann auch durch Aufliegen in einem Pulver, das aus Metallsalzen höherer Fettsäuren besteht, erfolgen. Dieses Verfahren wird in der schweizerischen Patentschrift 431 252 beschrieben.

Eine alternative Methode zur Herstellung von wirkstoffhaltigen, stabilen Zubereitungen wird in der europäischen Patentschrift EP-A 0 618 001 beschrieben. Hier erfolgt die Herstellung der kugelförmigen Partikel, die eine Einbettung des Wirkstoffs in einem Gemisch aus verschiedenen Trägersubstanzen darstellen, indem man zunächst durch kontrollierte Teilung Kügelchen aus einer primären Öl-in-Wasser-Emulsion bildet, die aus der Zugabe von Wirkstoffen, ölartigen Stoffen, Proteinen und Wasser zum einem nicht mit Wasser mischbaren Lösungsmittel besteht, und anschließend die erhaltenen Kügelchen abtrennt. Für die Herstellung der Kügelchen ist ein spezielles Mischsystem erforderlich. Die hierbei erhaltenen Partikel werden anschließend mit einem Aldehyd, beispielsweise Acetaldehyd, Glutaraldehyd oder Glyoxal nachbehandelt, wodurch eine chemische Vernetzung, die sich auch in der Wasserunlöslichkeit des erhaltenen Materials ausdrückt, und damit eine zusätzliche Stabilisierung des Wirkstoffs erreicht wird.

In der amerikanischen Patentschrift 4 670 247 wird eine weitere Methode zur Herstellung von vernetzten Partikeln beschrieben. Hierzu wird zunächst eine Emulsion, die im wesentlichen aus einem ölartigen Vitamin, einem Schutzkolloid wie z. B. Gelatine und einem reduzierenden Zucker besteht, durch einen Sprüh- und Trocknungsprozeß in pulverförmige Partikel überführt. Diese Partikel werden anschließend in einem thermischen Prozeß bei Temperaturen zwischen 105 und 180°C behandelt. In einer Maillard-Reaktion zwischen den Aminogruppen der Proteine und den Oxo-Gruppen der reduzierenden Zucker wird dabei eine Wasserunlöslichkeit der Trockenpulverpartikel erzielt, die durch eine Vernetzung der Matrixbestandteile erreicht wird.

In EP 782883 werden elbäre Mikrokapseln beschrieben, die eine Kapselwand enthalten, die durch Aussitzen des Proteins mit einem eßbaren Salz und Vernetzung der Kapselwand mit Transglutaminase hergestellt werden. Nachteilig bei dieser Methode ist, daß sie nicht breit anwendbar ist. So ist die Transglutaminase beispielsweise für Sprühformulierungen ungeeignet, da sie versprüht und getrocknete Wirkstoffformulierungen nicht mehr richtig quervernetzen kann und so die Wirkstoffe während der Lagerung schon einem verstärkten Abbau ausgesetzt sind. Wartet man bis die Quervernetzung durch die enzymatische Aktivität abgeschlossen ist, so lassen sich die Formulierungen nicht mehr versprühen.

Wenn oxidationsempfindliche Verbindungen, in diesem Falle insbesondere fettlösliche Vitamine und Carotinoide, mit Luft in Kontakt kommen, erfolgt eine Umsetzung mit Sauerstoff, die zu einem Wirkstoffverlust durch Umsetzung zu ungewünschten Verbindungen führt. Um diese Oxidation zu verhindern, kann man zum Beispiel bestimmte Zusätze den Zubereitungen hinzufügen, die durch Umsetzung mit reaktiven Gruppen der Proteine diese wiederum weniger durchlässig für Sauerstoff machen und dadurch den Wirkstoffen einen stabilisierenden Schutz verleißen. Dies kann beispielsweise dadurch geschehen, daß durch Umsetzung von Proteinen mit reduzierenden Zuckern im Sinne einer Maillard-Reaktion die Löslichkeit der Proteine in Wasser verhindert wird. Weiterhin kann durch Umsetzung der Proteine mit Aldehyden eine Vernetzung erreicht werden, die ebenfalls der Trägermatrix eine erhöhte Stabilität verleiht.

Diese Verfahren zeigen jedoch bestimmte Nachteile, die es wünschenswert erscheinen lassen, nach verbesserten Sta-

bilisierungsverfahren zu suchen. So bedeutet die Anwendung einer Maillard-Reaktion zwischen einem Protein und reduzierten Zuckern in jedem Falle eine thermische Belastung und damit zumindest in einem geringen Maße einen Abbau des Wirkstoffs. Außerdem neigen die Produkte zu einer bräunlichen Färbung. Ein Verfahren zur Formulierung von Wirkstoffen über Maillard-Reaktion ist beispielsweise der Patentanmeldung EP-A-4)547 422 zu entnehmen.

Von Nachteil bei der Verwendung von chemischen Agentien wie Aldehyden oder Säuren wie Tanninsäure als Vernetzungsmittel ist, daß zur Vernetzung hochreaktive und gesundheitlich nicht unbedenkliche Zusatzstoffe eingesetzt werden. Die Produkte, die nach diesen Verfahren hergestellt werden, finden beim Verbraucher nur bedingt unumschränkte Akzeptanz.

Es war daher die Aufgabe der Erfindung ein leichtes, kostengünstiges, breit anwendbares Verfahren zur Formulierung von Wirkstoffen zu entwickeln, das die oben genannten Nachteile nicht aufweist.

Diese Aufgabe wurde durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Wirkstoffzubereitungen, in denen ein oder mehrere Wirkstoffe von mindestens einer Schicht umgeben sind, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der den oder die Wirkstoffe umgebenden Schichten oder Teile dieser Schichten aus einem Protein bestehen, das mit einem Enzym ausgewählt aus der Gruppe der Lipoxygenasen, Proteindisulfidisomerasen, Phenoloxidasen und Peroxidasen, Lysyloxidasen, Proteindisulfidoxidasen, Tyrosinoxidasen oder Sulfhydryloxidasen quervernetzt wurde, gelöst.

Die chemische Funktion dieser Enzyme im Stoffwechsel bzw. ihre chemische Reaktion ist beispielsweise den Schriften von Green et al. (Biochem. J. 1983, 211, 481-493), Kagan et al. (Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 5, 1991, 206-210), Haywood et al. (Biochem. J., 1981, 199, 187-201) oder Mathies et al. (J. Food Biochem. 11, 1987, 309-327) zu entnehmen.

Durch die vorteilhafte enzymatische Vernetzung im erfindungsgemäßen Verfahren wird sowohl eine thermische Belastung der Wirkstoffe wie bei der thermischen Vernetzung der Protein/Zuckerschicht und ein damit verbundenes Bräunen der Wirkstoffformulierungen über die Maillardreaktion sowie die Verwendung reaktiver chemischer Substanzen wie Aldehyde vermieden. Die Maillardreaktion bei der thermischen Vernetzung führt zu einer Verknüpfung von reduzierenden Zuckern mit den freien Aminogruppen der Proteine oder sonstigen freien Aminogruppen und damit zu einer Stabilisierung der Wirkstoffformulierungen. Bei der Verwendung von chemischen Verbindungen zur Vernetzung der Proteine bilden sich Brücken zwischen den Aldehyden in der Regel den Dialdehyden und den Aminogruppen der Proteine oder sonstigen Aminogruppen aus. Im erfindungsgemäßen Verfahren werden die Proteine direkt beispielsweise über in den Proteinen oder Lipoproteinen vorhandenen Fettsäureresten, über Cystein-Cysteinbrücken (= Cystinbrücken), über Michaeladditionsprodukte oder über die Bildung von Aldehyden aus Lysin mit anschließender Vernetzung über freie Aminogruppen vernetzt.

Dies führt zu den neuen erfindungsgemäßen Wirkstoffzubereitungen enthaltend mindestens einen einen oder mehrere Wirkstoffe umgebende Schicht oder Teile einer Schicht aus einem Protein, das mit einem Enzym ausgewählt aus der Gruppe der Lipoxygenasen, Proteindisulfidisomerasen, Phenoloxidasen und Peroxidasen, Lysyloxidasen, Proteindisulfidoxidasen, Tyrosinoxidasen oder Sulfhydryloxidasen quervernetzt wurde. Diese erfindungsgemäßen Wirkstoffzubereitungen weisen bei einer guten Stabilität keine bräunliche Färbung auf und enthalten keine chemischen Vernetzer.

Als Wirkstoffe im erfindungsgemäßen Verfahren oder in den erfindungsgemäßen Wirkstoffzubereitungen sind prinzipiell alle in der Pharmazie, Human- oder Tierernährung verwendeten Wirkstoffe geeignet. Bevorzugte Wirkstoffe sind Vitamine, Enzyme, Lebensmittel- und Futtermittelzusatzstoffe.

Unter Enzymen im erfindungsgemäßen Verfahren oder in den Wirkstoffzubereitungen sind als Wirkstoff Enzyme wie z. B. Hydrolasen wie Amidasen, Proteasen, Lipasen, Esterasen, Phospholipasen, β -Glucosidasen, Amylasen, Nitrilasen, Mannanasen, Phytinasen oder Xylanasen, Transferasen wie Methyltransferasen oder Aminotransferasen, Oxidoreduktasen wie Glucosyloxidase oder Isomerasen beispielhaft zu verstehen.

Insbesondere sind hydrophobe Wirkstoffe bevorzugt, besonders bevorzugt solche, die leicht oxidierbar sind. Solche sind die Vitamine der Gruppen A, D, E und K sowie deren Mischungen speziell den Mischungen mit Carotinoiden und/oder Xanthophyllen. Sie können im Rahmen der Erfindung in Form von Vitaminlösungen in Ölen, als Provitamin sowie als reine Vitamine natürlichen oder synthetischen Ursprungs eingesetzt werden. Von besonderem Interesse sind Präparate von Vitamin D, Vitamin K₁, Vitamin A und dessen Derivaten, insbesondere von Vitamin-A-Acetat, Vitamin-A-Palmitat und Vitamin-A-Propionat sowie deren Mischungen. Auch die verschiedenen Vitamin B-Derivate wie Vitamin B₁-Acetat, Vitamin B₁-Palmitat sind von Interesse. Bevorzugte Lebensmittel- und Futtermittelzusatzstoffe sind Carotine, Xanthophylle und Carotinoide wie β -Carotin und wie z. B.: Astaxanthin, Astacin, Bixin, Norbixin, Capsocubin, Violaxanthin, Rubixanthin, Phodoxanthin, Apo-8'-carotinsäureethylester, Neurosporaanthin, Citranaxanthin, Canthaxanthin, Zeaxanthin, β -apo-4'-carotinal, β -apo-8'-carotinal, β -apo-12'-carotinal, β -apo-8'-carotinsäure, Lutein, Capsanthin. Lycopin sowie Ester von hydroxy- und carboxylhaltigen Vitaminen dieser Gruppe, z. B. die niederen Alkylester wie Methyl- oder Ethylester oder deren Mischungen.

Die Anteile an den Wirkstoffen betragen in den erfindungsgemäßen Wirkstoffzubereitungen im allgemeinen etwa 1 bis 75 Gew.-%, vorzugsweise 5 bis 50 Gew.-%, besonders bevorzugt 10 bis 35 Gew.-%, bezogen auf die Trockenmasse der Pulver.

Die Anteile an Vitaminen oder Carotinoiden betragen im allgemeinen etwa 5 bis 50 Gew.-%, vorzugsweise 10 bis 35 Gew.-%, bezogen auf die Trockenmasse der Pulver.

Bevorzugt sind erfindungsgemäße Verfahren, bei denen eine wirkstoffhaltige Emulsion oder Dispersion in eine mit hydrophobierter Kieselsäure beladene Atmosphäre, die gegebenenfalls inertisiert sein kann, versprüht wird. Die Atmosphäre kann vorteilhaft auch mit einem anderen Puderungsmittel wie einem Mittel auf Basis eines Kohlenhydrats wie Stärke oder modifizierter Stärke beispielsweise Maisstärke beladen sein.

Außerdem sind Verfahren bevorzugt, bei denen nach dem Herstellen der Wirkstoffzubereitung beispielsweise über Versprühen getrocknet wird. Dabei wird bevorzugt bis zu einer Restfeuchte unter 10 Gew.-%, bevorzugt unter 6 Gew.-% getrocknet. Auch geringere Restfeuchten können eingestellt werden.

Die Temperatur des erfindungsgemäßen Verfahrens wird im Wesentlichen unter 80°C, bevorzugt unter 60°C, gehalten. Die Erfindung betrifft außerdem Wirkstoffzubereitungen erhältlich nach einem erfindungsgemäßen Verfahren, und

solche, die als zusätzliches Merkmal den 0,025-fachen bis 4-fachen Gewichtsanteil bezüglich Wirkstoff an Trennmittel oder Trennmittelgemischen enthalten, sowie Lebensmittel oder Futtermittel enthaltend eine solche Wirkstoffzubereitung.

- 5 Bevorzugte Trennmittel sind hydrophobisierte Kieselsäuren, Maisstärke, durch chemische Behandlung hydrophobisierte Maisstärke, Metallsalze höherer Fettsäuren und andere pflanzliche Stärken oder Mischungen dieser Trennmittel. Besonders bevorzugt sind Mischungen aus mindestens einem dieser Trennmittel mit weiteren Hilfsstoffen wie anorganischen Verbindungen, die als Gleitmittel wirken, wie zum Beispiel Neusilin® oder Zeoxol®.

- 10 Im Fall von hydrophober Kieselsäure liegt der Anteil bezüglich Wirkstoff bevorzugt in einem Bereich zwischen 0,025 und 0,4, besonders bevorzugt zwischen 0,05 und 0,2. Bei Maisstärke liegt das entsprechende Verhältnis bevorzugt zwischen 0,25 und 2, besonders bevorzugt zwischen 0,5 und 1,5.

- Die erfindungsgemäßen Wirkstoffzubereitungen sind erfindlich durch Herstellung einer Dispersion enthaltend im wesentlichen diese Wirkstoffe, ein Protein und weitere Träger- und Füllstoffe z. B. aus der Gruppe der Kohlenhydrate und/oder natürliche oder chemisch modifizierte Stärken. Sie kann noch weitere Zusatzstoffe wie Stabilisatoren oder Emulgierhilfsmittel enthalten. Außerdem enthält sie ein Enzym, das in der Lage ist, auf verschiedene Weise Proteinmoleküle miteinander zu vernetzen. Die hierdurch erzielte Vernetzung verleiht dem Protein und damit auch der Matrix, in dem die Wirkstoffe eingebettet sind, eine verminderte Wasserlöslichkeit und somit eine erhöhte Stabilität.

- Als Protein im erfindungsgemäßen Verfahren können prinzipiell alle Proteine verwendet werden. Bevorzugte vernetzbare Proteine sind aus wirtschaftlichen Gründen Gelatine, Kasein, Soja-Proteine, Wäpzeiproteine, Mais-Protein und Kollagen.

- 70 Bevorzugte vernetzbare Proteine sind alle Formen von pflanzlichen oder tierischen Proteine wie Gelatine, z. B. Knochengelatine, Rindergelatine, Fischgelatine, Milchproteine, wie z. B. Kasein, Sojaproteine, Weizenproteine wie Gluten, Maisproteine und Kollagen, besonders bevorzugte Proteine sind Gelatine, Milchproteine und Sojaproteine. Unter Gelatine im erfindungsgemäßen Verfahren sind alle Formen von Gelatine zu verstehen, egal, ob es sich um natürliche Gelatine handelt oder um chemisch modifizierte Derivate.

- 25 Für die Herstellung der Dispersion wird bei dem erfindungsgemäßen Verfahren vorteilhaft Gelatine des A- und B-Typs in einem weiten Bloombereich eingesetzt. Mit besonderem Vorteil arbeitet man mit Gelatine mit einem Bloomwert von etwa 50 bis etwa 250.

- Die Gelatine verwendet man erfindungsgemäß in Mengen von 10 bis 50 Gew.-%, vorzugsweise 15 bis 40 Gew.-%, insbesondere 20 bis 35 Gew.-%, bezogen auf die Trockenmasse der Wirkstoffzubereitung.

- 30 Vorteilhaft werden den Proteinen zur mechanischen Stabilisierung Weichmacher wie Zucker und/oder Zuckeralkohole wie Saccharose, Glucose, Sorbit, Sorbose, Mannit oder Polyole wie Glycerin zugesetzt.

- Die erfindungsgemäßen vernetzenden Enzyme sind ausgewählt aus der Gruppe der Lipoxygenasen, Proteinisulfotransferasen (bevorzugt E.C.-Klasse 5.3.4), Phenoloxidasen (bevorzugt E.C.-Klasse 1.14.) und Peroxidasen (bevorzugt E.C.-Klasse 1.11), Lysyloxidasen (bevorzugt E.C.-Klasse 1.4.3), Proteinisulfidreduktasen (bevorzugt E.C.-Klasse 1.4.4), Tyrosinoxidasen (bevorzugt E.C.-Klasse 1.14) oder Sulfhydryloxidasen (bevorzugt E.C.-Klasse 1.8). Diese können tierischen, pflanzlichen oder mikrobiellen Ursprungs sein. Bevorzugt sind sie mikrobiellen Ursprungs, das heißt aus Eukaryonten wie Pilzen oder Hefen oder Prokaryonten wie grampositiven oder gram-negativen Bakterien oder Archaeobakterien. Bevorzugt werden als Enzym die Lysyloxidasen verschiedenen Ursprungs verwendet. Besonders bevorzugt werden die Lysyloxidasen aus Hefen wie aus den Gattungen *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Sporobolomyces*, *Sporopachyderma*, oder *Trigonopsis* verwendet. Ganz besonders bevorzugt sind Lysyloxidasen aus den Gattungen und Arten *Candida rugosa*, *Candida nonmelodra*, *Candida boidinii*, *Candida lipolytica*, *Candida sheatolytica*, *Candida tropicalis*, *Candida utilis*, *Hansenula minuta*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pinus*, *Pichia pastoris*, *Sporobolomyces albobrevens*, *Sporopachyderma cerealea* oder *Trigonopsis variabilis*. Herausragend geeignet für das erfindungsgemäße Verfahren ist die Lysyloxidase aus der Gattung und Art *Pichia pastoris*.

- 45 Die erfindungsgemäße Lysyloxidase von *Pichia pastoris* läßt sich aus der Zellmasse von *Pichia pastoris* Zellen über einen Zellaufschluß, der mit üblichen Methoden durchgeführt wurde, einer Ionenaustauschchromatographie mit einer anschließenden Molekularsiebchromatographie und abschließender nochmaliger Ionenaustauschchromatographie aufreinen. Mit diesem Reinigungsschema konnte die Lysyloxidase mit einer Reinheit von über 90%, bevorzugt von über 95%, besonders bevorzugt von über 99% dargestellt werden.

- 50 Die aufgereinigte Lysyloxidase wurde einer Proteinsequenzierung nach Edman unterzogen. Dabei wurde das N-terminale Ende sowie verschiedene Peptide, die in einem Verdau mit Trypsin erhalten wurden, bestimmt (siehe Beispiel 5). Die Erfindung betrifft damit ein isoliertes Protein, das mindestens eine der folgenden Sequenzen enthält:

- 55 eine amnoternminale Sequenz

GS(G)CQ(Q)KTNKYNIEAPKPN(C)DTL(S)

oder Teilsequenzen, die Peptiden des Proteins entsprechen, die nach einem Verdau mit Trypsin erhalten wurden:

- 60 EYP(C)APGVVYNTR
GGYTVTVQNPTNR
DYNNMPGGGVHR
ATGGTYSIVXAQN
APETENNA
65 GPLPVNLGYITPLSFYNT
IVELSLQELHABYGSDDPNQNH(Y)SDI
DVDDDI SCTHQR
VAPETENCAR

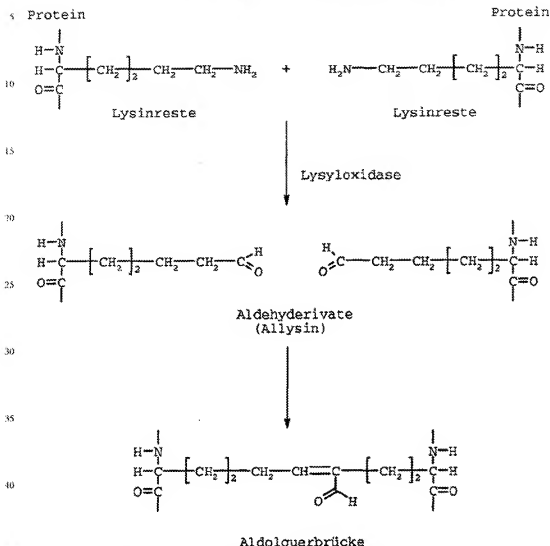
NVDVEYPCAPGVVYNTK
GYPNAEY(S)LDMEER

und das die ϵ -Aminogruppen des Lysins speziell in einem Protein zu Aldehydgruppen oxidieren kann. Die Buchstaben und Zeichen in den oben genannten Sequenzen haben folgende Bedeutung: X ist eine unbekannte Aminosäure, die an dieser Position nicht identifiziert werden konnte, die Klammern bedeuten nicht eindeutig ermittelbare Aminosäuren, wobei die angegebenen Aminosäure, die wahrscheinlich richtige Aminosäure ist, der Schrägstrich bedeutet Aminosäurealternativen, wobei die Aminosäure vor dem Schrägstrich oder die nach dem Schrägstrich an der Position richtig sein kann. Durch die Oxidation der ϵ -Aminogruppen kommt es schließlich zur Quervernetzung von Proteinen, wobei Bereiche desselben Proteins miteinander vernetzt werden können oder verschiedener Proteine.

Die Lysyloxidase (= PROTEIN-LYSINE 6-OXIDASE, EC 1.4.3.13 oder LYSYL OXIDASE) speziell die Lysyloxidase von *Pichia pastoris* ermöglicht die enzymatische Quervernetzung von Proteinen, wobei als Protein vorteilhaft Gelatine verwendet wird. Dabei werden die ϵ -Aminogruppen der Lysine zu Aldehydgruppen oxidiert. Diese Aldehyde können dann unter Bildung Schiff'scher Basen mit den Aminogruppen anderer Lysine oder anderen freien Aminogruppen beispielsweise Aminoazuckern reagieren. Ein besonderer technischer Vorteil für den Anwender ist die zeitliche Trennung innerhalb der gesamten Reaktionssequenz, das heißt, die Bildung der Aldehyde aus den ϵ -Aminogruppen der Lysine und die Reaktion der Aminogruppen mit den gebildeten Aldehydgruppen ist zeitlich getrennt. Dies bietet gegenüber beispielsweise der enzymatischen Quervernetzung mit Hilfe der Transglutaminase einen wesentlichen Fortschritt, da bei dieser Reaktion immer sofort die Vernetzung erfolgt und damit keine zeitliche Trennung in der Enzymreaktion und der Vernetzung möglich ist. Diese zeitliche Trennung ermöglicht die vorteilhafte Verwendung der enzymatischen Reaktion für Verfahren wie zum Beispiel die Herstellung von Wirkstoffzubereitungen über Sprühtrocknung oder über das sogenannte Mikronisierungsverfahren (siehe EP-A-0 065 193). Ein weiterer Vorteil ist die Unbedenklichkeit der gebildeten Moleküle, da sie ein natürlicher Bestandteil des Bindegewebes sind (Abb. 1 und 2). Sie werden dort von einer Gewebe-Lysyloxidase erzeugt.

Abb. 1

Bildung einer Aldolquerbrücke aus zwei Lysinseitenketten



Die genannten Enzyme können in Form der gereinigten Enzyme oder in Form von Rohextrakten aus natürlichen Quellen wie aus Eukaryonten wie Pilzen, Hefen, tierischen oder pflanzlichen Zellen oder Prokaryonten wie gram-positiven, gram-negativen Bakterien oder Archaeobakterien verwendet werden. Auch ganze Organismen oder Zellen können für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden, soweit die Enzyme ins extrazelluläre Milieu sezerniert werden oder die Zellen permeabilisiert wurden. Bevorzugt wird das erfindungsgemäße Verfahren mit gereinigten Enzymen oder, soweit keine unerwünschten Nebeneaktivitäten vorhanden sind, mit Rohextrakten durchgeführt.

Die für die Quervernetzung der Proteine benötigten Enzymmengen bzw. -aktivitäten lassen sich in herkömmlicher Weise in dem Fachmann bekannter Art durch einfache Vorversuche bestimmen. Üblicherweise werden die Enzyme in einer Menge zugesetzt, daß 20 bis 100% der quervernetzenden Gruppen beispielsweise der Lysinreste im Protein vernetzt werden. Vorteilhafterweise werden 0,001 bis 1000 Units Enzym pro Gramm Protein, vorzugsweise 0,01 bis 100 Units Enzym pro Gramm Protein, besonders bevorzugt 0,1 bis 10 Units pro Gramm Protein zugesetzt.

Die Wirkstoffzubereitungen können einen oder mehrere Wirkstoffe enthalten, wobei unterschiedliche Wirkstoffklassen wie Vitamine oder Carotinoide oder mehrere Wirkstoffe einer Wirkstoffklasse beispielsweise mehrere verschiedene Carotinoide oder Vitamine oder deren Mischungen in den Zubereitungen enthalten sein können.

Die Wirkstoffe in den Zubereitungen können von einer oder mehreren Schichten umgeben sein. Diese Schichten können aus natürlichen oder künstlichen quervernetzten Proteinschichten oder aus einer oder mehreren erfindungsgemäß quervernetzten Proteinschichten und mindestens einer chemisch quervernetzten Proteinschicht und/oder weiteren Schichten aus natürlichen oder künstlichen Polymeren bestehen. Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren quervernetzten Proteine können auch Teile mindestens einer den oder die Wirkstoffe umgebenden Schicht sein.

Unter natürlichen und/oder künstlichen Polymeren sind prinzipiell alle Polymere denkbar, die für die Formulierung von Wirkstoffen geeignet sind. Als natürlichen Proteine seien beispielsweise Polymere wie Giar Gum, Alginate, Carrageenan, Pektine oder Polymere auf Basis von Mannose und/oder Galaktose genannt. Als künstliche Proteine seien beispielsweise Polymere auf Basis von Acrylsäure, Methacrylsäure, Acrylaten, Methacrylaten oder Mischungen aus die-

sen Monomeren wie beispielsweise Eudragit L30D-55 (Methacrylsäure : Ethylacrylat, 1 : 1) oder Eudragit S (Methacrylsäure : Methylmethacrylat, 1 : 2). Auch andere Monomere können in den Polymeren enthalten sein beispielsweise Monomere, die eine positive Ladung mitbringen wie Trimethylammonioethylmethacrylat, Polylysine oder Polyallylamin. Je nach verwendetem Polymer oder Polymergemisch lassen sich mit Hilfe der erfindungsgemäßen Schichten herstellen, die es vorteilhaft ermöglichen den oder die Wirkstoffe so zu formulieren, daß sie gezielt am Wirkort freigesetzt werden können. So lassen sich Schichten erzeugen die beispielsweise Magensaft-resistent sind, die sich im Darm auflösen, die sich gezielt im Magen auflösen, die durch das Pansenmilch nicht aufgelöst werden oder die bei Verbringung in den Körper den Wirkstoff erst nach einiger Zeit freigeben. In Futter- oder Nahrungsmitteln kann der Wirkstoff so formuliert werden, daß er erst nach Aufnahme der Wirkstoffzubereitung in den Körper freigesetzt wird.

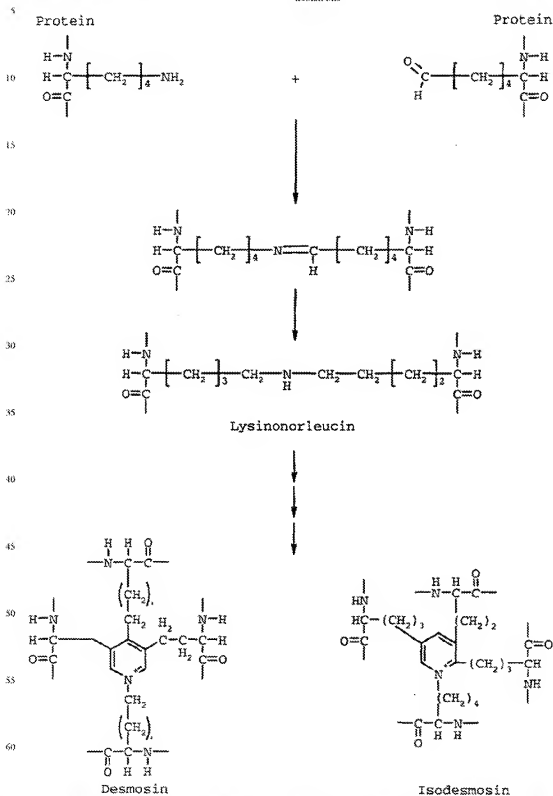
Vorteilhaft wird der Wirkstoff oder die Wirkstoffe von einer oder mehreren über das erfindungsgemäße Verfahren quervernetzten Proteinschichten umgeben.

Die die Wirkstoffzubereitungen enthaltenden Emulsionen werden vorteilhaft unter Verwendung von hydrophoben Trennmitteln wie hydrophobe Kieselsäure, natürliche Stärke, wie z. B. Maisstärke, hydrophobisierte Stärkederivate, wie z. B. hydrophobisierte Maisstärke, Salzen von langkettigen Fettsäuren oder Gemischen aus diesen Stoffen versprüht. Das Trennmittel kann aber auch in der Sprühkammer z. B. als hydrophobe Kieselsäurepartikel in Luft oder Inertgas (z. B. Stickstoff) vorgelegt werden. Anschließend erfolgt die Trocknung der versprühten Partikel gegebenenfalls nach Abtrennung der Trennmittel, gegebenenfalls unter leichter Erwärmung bis 80°C, bevorzugt bis 60°C, besonders bevorzugt bei Raumtemperatur, durch Behandlung in einem Luft- oder Schutzgasstrom.

Zusätzlich zu den obligatorischen Bestandteilen werden der Dispersion mit Vorteil noch andere, bei der Herstellung von Wirkstofftruckenpulvern übliche Verbindungen, zugefügt.

Abb. 2

Reaktion der Lysinreste mit Allylsin zur Schiff'schen Base und weitere Reaktion zu Lysinonorleucin, Desmosin und Isodesmosin



Von besonderer Bedeutung für einen Einsatz der Trockenpulver als Futtermittelzusatz ist bei oxidationsempfindlichen Wirkstoffen ein Zusatz von Antioxidantien, wie Bihydroxyquin, butyliertes Dihydroxytoluol (BHT), butyliertes Hydroxyanisol (BHA) oder Tocopherol, sowie Stabilisatoren, wie Ascorbylpalmitat, Mono- und Diglyceride, Ester von Monoglyceriden mit Essigsäure, Zitronensäure, Milchsäure, Diacetylweinsäure, Polyglycerinfettsäureester, Sorbitanfettsäureester,

Propylen glykolfettsäureester, Stearoyl-2-Lauryl, Phosphorsäure oder Phytinsäure und deren Alkali- oder Erkalikal-
salze, oder aber Komplexbildner, wie Ethylen diamineressigsäure (EDTA) oder Nitrilotriessigsäure (NTA).

Häufig werden der Emulsion aber auch Feuchthaltemittel, wie Glycerin, Sorbitol, Polyvinylpyrrolidon oder Polyethyl-
englykole oder auch zusätzliche Emulgatoren, wie Lecithin, zugefügt.

Darüberhinaus haben sich Zusätze wie Kohlenhydrate wie Zucker, Stärke oder Stärkederivate insbesondere Mais-
stärke oder Malohdextrin oder Dicksungsmittel, wie Gummiarabicum, Guar gummi, Tragant, Agar Agar, Carrageenan,
Locust-Bean-Gum, Alginate, Pektine, Xanthan, Cerdan und bestimmte abgebaute Stärken zur Einstellung der Viskosität
der Emulsion als nützlich erwiesen.

Bezüglich näherer Details über Bedeutung, Art und Menge solcher Zusätze verweisen wir auf entsprechende Fachlitera-
tur, beispielsweise auf die obengenannte Monographie "Fat-soluble Vitamins", Vol. 9, insbesondere Seiten 128 bis
133.

Durch diese Zusätze werden die Wirkstoffzubereitungen vorteilhaft stabilisiert und an die besonderen Darreichungs-
bedingungen angepasst.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geht man beispielsweise so vor, daß man zur Herstellung der
die Wirkstoffe enthaltenden Dispersion Gelatine in heißem Wasser (von 50 bis 70°C) zur Lösung bringt, zu dieser Lö-
sung die Zucker, die Aminoverbindungen, die Vitamine und/oder Carotinoide, Stabilisatoren und die anderen üblichen
Zusatzstoffe sowie ggf. noch zusätzlich Wasser schüttet und das Ganze durch kräftiges Rühren bei erhöhter Temperatur
dispargiert. Für die im letzten Verarbeitungsschritt erfolgende enzymatische Vernetzung des Pulvers sollte die fertige Dis-
persion in einem pH-Bereich von 4 bis 10 vorliegen, welcher durch Zugabe von Basen, wie NaOH, KOH, Ca(OH)₂,
MgO, Soda oder NH₄OH oder durch Zugabe von basischen reagenreinen Salzen wie Natriumacetat oder Na₂HPO₄ einge-
stellt werden kann. Die so hergestellte Dispersion kann nach üblichen Methoden in ein trockenes Pulver überführt wer-
den beispielsweise durch Sprühtrocknung, Sprügranulation oder sonstige übliche Trocknungsmethoden.

Weitere Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens sind beispielsweise die Verwendung der enzymati-
schen Quervernetzung bei den unterschiedlichen Mikronisierungsverfahren.

In EP-B-0 065 193 wird beispielsweise ein Verfahren zur Herstellung von sehr feinvvertelten freiließenden Pulvern
der Carotinoide beschrieben, wobei das Carotinoid in einem flüchtigen, mit Wasser mischbaren organischem Lösungs-
mittel bei Temperaturen zwischen 50°C und 200°C, gegebenenfalls unter erhöhtem Druck, innerhalb einer Zeit von we-
niger als 10 Sekunden gelöst wird und anschließend die so erhaltene molekular disperse Lösung sofort durch schnelles
Mischen mit einer wässrigen Lösung eines quellbaren Kolloids bei Temperaturen zwischen 0°C und 50°C der Wirkstoff
in kolloiddisperser Form ausfällt. Die Dispersion wird anschließend vom Lösungsmittel und dem Dispersionsmedium in
üblicher Weise befreit. Als quellbare Kolloide werden Proteine verwendet. Diese können durch Zugabe der oben genan-
ten Enzyme im erfindungsgemäßen Verfahren quervernetzt werden. Vorteilhafterweise werden die Enzyme der wässrigen
Mikronisierungsdispersion vor dem Trocknungsschritt zugesetzt, damit genügend reaktive Gruppen für die Vernetzung hergestellt
werden, bevor die Trocknung erfolgt. Weitere Angaben zum Verfahren sind EP-B-0 065 193 zu entnehmen.

EP-B-0 410 236 beschreibt ein weiteres Verfahren zur Herstellung einer kolloid-dispersen Carotinoidpréparation, wo-
bei eine Suspension eines Carotinoids in einem hochsiedenden Öl während einer Zeildauer von höchstens 30 Sekunden
mit überhitztem Wasserdampf in Kontakt gebracht wird. Anstelle des Öls für das Lösen der Carotinoide können auch orga-
nische Lösungsmittel wie Chloroform, Methylchlorid, Tetrachlorkohlenstoff oder Trichlorethylen verwendet wer-
den (siehe DEOS 12 11 911). Anschließend wird das erhaltene Gemisch mit einer wässrigen Lösung eines Schutzkollo-
ids emulgiert und die Emulsion danach versprüht und getrocknet. Auch hier werden als Schutzkolloide Proteine ver-
wendet, die im erfindungsgemäßen Verfahren über die Zugabe der genannten Enzyme vor dem Versprühen und Versprü-
hen quervernetzt werden können. Weitere Angaben zum Verfahren sind EP-B-0 410 236 zu entnehmen.

EP-B-0 498 824 beschreibt ein zusätzliches vorteilhaftes Verfahren zur Herstellung von mikrodispersen Wirkstoffzu-
bereitungen. Dabei wird als Wirkstoff ein Carotinoid in Gegenwart eines Schutzkolloids beispielsweise eines Proteins
wie Gelatine gerahnt und die gebildete Suspension anschließend getrocknet.

Durch Zusatz der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Enzyme lassen sich die Proteine vorteilhaft vernet-
zen und die Wirkstoffzubereitung stabilisieren. Nähere Angaben zum Herstellungsverfahren sind der genannten Patentschrift
und WO 94/19411 zu entnehmen.

Die anschließende Weiterverarbeitung der Dispersion zu den erfindungsgemäßen Pulvern kann nach allen literaturbe-
kannten Verfahren erfolgen.

Wegen der gewünschten Kornverteilung der Pulver (0,1 bis 0,6 mm Durchmesser) werden solche Verfahren bevor-
zugt, bei denen Vorkehrungen getroffen werden, daß die gelierten Tröpfchen der Dispersion voneinander getrennt blei-
ben, bis sich ihre Form stabilisiert hat.

Genannt seien beispielsweise das Verfahren gemäß EP-B1-74050, bei dem die Dispersion in hydrophobe Kieselsäure
oder ein Metallsalz einer höheren Fettsäure versprüht wird oder aber das Verfahren gemäß EP-B1 285 682, bei dem die
Dispersion in Stärkelpulver versprüht wird. Es hat sich erwiesen, daß insbesondere bei Verfahren, die für Zubereitungen
mit Gelatine Gehalten unter 35 Gew.-% eingesetzt werden, die Versprühung mit hydrophobierten Kieselsäuren als Pu-
lvermittel besonders vorteilhaft durchführbar ist.

Die nach den beschriebenen Verfahren erzeugten Pulver besitzen nach dem Trocknen einen Wassergehalt von weniger
als 10%, normalerweise weniger als 6%. Die so erhaltenen pulverförmigen Präparate bestehen aus Teilchen mit gut aus-
gebildeter Oberfläche. Sie lösen sich in warmem Wasser von ca. 40°C rasch in einer nützlichen Dispersion.

Die erfindungsgemäßen Wirkstoffzubereitungen eignen sich vorteilhaft zur Herstellung pharmazeutischer Zubereitun-
gen, sowie zur Herstellung von Lebensmitteln und Futtermitteln.

Beispiele

Beispiel 1

5 Herstellung der L-xyloxydase mit *Pichia pastoris* - Le 583 -

Der Stamm wurde auf YM-Agar kultiviert:

10 3 g/l Malt Extract Difco
5 g/l Pepton Difco
3 g/l Yeast Extract Difco
20 g/l Agar Difco

15 Die Platten wurden bei 28°C für 48 h bebrütet und sind danach bei 45°C für mindestens 4 Wochen haltbar.

Vorkultur und Fermentationsmedium

10 g/l Glucose (30 min. bei 121°C autoklavieren)
70 separat ansetzen und 30 min bei 121°C autoklavieren:

0,2 g/l Magnesiumsulfat $\times 7 \text{ H}_2\text{O}$
3,0 g/l Kaliumdihydrogenphosphat
0,2 ml/l Salzlösung nach Vishniac & Santer*

25 separat ansetzen und steriltfiltrieren:

10 ml/l Vitaminlösung nach Lodder**

30 Die Mediumsbestandteile werden nach der Sterilisation vereinigt.

* Rezeptur der Salzlösung: Nach Vishniac & Santer

50 g/l Triplex III
35 22 g/l Zinksulfat $\times 7 \text{ H}_2\text{O}$
5,54 g/l Calciumchlorid
5,06 g/l Manganchlorid $\times 4 \text{ H}_2\text{O}$
4,99 g/l Eisensulfat $\times 7 \text{ H}_2\text{O}$
1,1 g/l Ammoniumheptamolybdat $\times 4 \text{ H}_2\text{O}$
40 1,57 g/l Kupfersulfat $\times 5 \text{ H}_2\text{O}$
1,61 g/l Cobaltchlorid $\times 6 \text{ H}_2\text{O}$

mit KOH auf pH 6,0 einstellen

45 ** Rezeptur der Vitaminlösung nach Lodder

20 µg/l Biotin
20 000 µg/l Ca-pantothenat
2 µg/l Folsäure
50 10 000 µg/l Inositol
200 µg/l p-Aminobenzoesäure
400 µg/l Niacin (Nicotinsäure)
400 µg/l Pyridoxinhydrochlorid
200 µg/l Riboflavin
55 400 µg/l Thiaminhydrochlorid

Vorkultur

60 Für einen 10 l-Fermenter wurden 2 \times 250 ml Vorkultur (= VK) im 1 l-Erlenmeyerkolben (= EMK) mit jeweils 3-4 Plattinösen Le 583 beimpft und 24 h bei 28°C und 200 Upm inkubiert.

Hauptkultur

65 Ansatz im 10 l-Infors-Fermenter mit folgenden Bedingungen:

Temperatur: 28°C
Beflüftung: 5 l/min. über Ringbegasung
Drehzahl: 400 Upm.

Fermenterbestückung: 3 x Standardrührbläser sowie eingebaute Wellenbrecher

Vor dem Start der Fermentation wurde durch die Zugabe von 50%iger (V/V) n-Butylaminlösung in Wasser der pH auf ca. 7,0 eingestellt. Anschließend wurde der Fermenter mit 2 x 250 ml Vorkultur beimpft. Die Fermentationsdauer betrug etwa 28-30 h. Der Zeitpunkt des Fermentationsendes wurde über die Bestimmung der OD bei 600 nm festgelegt. Die OD 600 der Fermenterproben wurde dabei gegen Luft gemessen und sollte bei 0,9-1,0 liegen. Bei höherer OD nimmt die Aktivität des Enzyms schnell ab.

Aufarbeitung

Der Fermenterinhalt wurde in einer Heraeus Cryofuge 8000 bei 45°C und 5000 Upm (entspricht ca. 9500 x g) 20 min zentrifugiert. Die gesamte Biofuchtmasse wurde in 250 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellmasse kann bei -15°C im Tiefkühlschrank gelagert werden.

Zeitaufschluß und Messung der Lysyloxidase

Die Biofuchtmasse (100 ml) wurde mit 100 ml Glasperlen (Durchmesser 0,5 mm) in der Kugelmühle unter Flüsskühlung 30 Minuten bei 5000 Umdrehungen pro Minute zerkleinert. Das Homogenat wurde über Gaze filtriert und dann für 10 Minuten bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Aktivität des Überstandes wurde durch einen HPLA-Test ermittelt. Die Lysyloxidase wandelt Benzylamin in Benzaldehyd um (Detektion bei 250 nm). Die Menge an entstandenem Benzaldehyd wurde über eine Eichkurve ermittelt.

Laufbedingungen

Puffer A: Wasser, 0,1% TFA
Puffer B: Acetonitril, 0,1% TFA

0 Minuten 40% B
6 Minuten 70% B
6,1 Minuten 100% B
6,5 Minuten 100% B
Fluß 1 ml/min
6,5-9 min zurück auf 40% B, Fluß 1,5 ml/min

Die Lysyloxidase enthaltenden Überstände von 7 x 10³ Fermentern wurden gesammelt und vereinigt. Es ergab sich eine Aktivität von 125,5 U/l in 1,8 l.

Beispiel 2

Markierung der Gelatine mit Fluoreszenzfarbstoffen und Quervernetzung der Gelatine durch die Lysyloxidase

Gelatine (10 g) wurde in 50 mM Natriumborapuffer pH 9,0 gelöst. Der pH wurde kontrolliert und mit 0,5 M NaHCO₃ nachgestellt. Die Fluoreszenzfarbstoffe Cy-5 oder Bodipy 630/650-X, SE) wurden in 5 ml DMSO (= Dimethylsulfoxid) gelöst und in einem Gewichtsverhältnis von 1 : 100 den Proteinen zugesetzt. Während 16 Stunden bei Raumtemperatur reagierten die Succinimidylester der Farbstoffe mit den freien Aminogruppen der Proteine. Die Reaktionsansätze wurden dann 5 mal gegen große Volumina 20 mM Natriumphosphatpuffer mit 0,01% Azid dialysiert und bei -20 Grad Celsius als 1%ige Proteinlösung gelagert.

In einem 4 l-Rührkolben wurden in 1800 ml einer Lösung, bestehend aus vereinigten Überständen von Lysyloxidase-Fermentationslösungen (ZH 29303/5; 125,5 U/l) bei 40°C 45 g Gelatine A 100 Bloom durch Rühren in Lösung gebracht. Dazu wurde mit Bodipy dotierte Gelatine (siehe oben) gegeben. Der gesamte Ansatz wurde 48 h bei 40°C gerührt, wobei der Kolben nicht geschlossen wurde, um einen dauernden Luftzutritt und damit den Zutritt von Sauerstoff zu ermöglichen.

Es wurden aus der Lösung in den angegebenen zeitlichen Abständen Proben à 300 g entnommen:

Probe 1: sofort nach Beginn des Versuchs
Probe 2: nach 2 Std.
Probe 3: nach 5 Std.
Probe 4: nach 24 Std.
Probe 5: nach 29 Std.
Probe 6: nach 48 Std.

Die Proben wurden wie folgt aufgearbeitet:

- 200 g wurden mit einer Feinstoffdüse direkt in eine Wolke aus hydrophobierter Kieselsäure (Sipernat D 17) zu Partikeln von ca. 200 µm Durchmesser versprüht. Das ethalene feuchte Produkt wurde geteilt, eine Hälfte wurde bei Raumtemperatur und die andere bei 80°C jeweils auf einer Nutsche im Luftstrom getrocknet.
- Die restlichen 100 g wurden nach Zusatz von Vitamin A, Isosweet und Maisstärke nach Einemulgierung der Öl-Phase mit einem Ultramix-Gerät in gleicher Weise versprüht und durch Trocknung des Sprühproduktes bei Raum-

temperatur in ein Trockenpulver umgewandelt. Diese Produkte hatten etwa folgende Zusammensetzung:

25% Vitamin A-Acetat stab. mit Ethoxyquin und BHT
30% Gelatine A 100 Bloom
25% Maisstärke
15% Isosweet
Rest: Wasser + Sipernat D 17 + Reste aus Fermentationsrückstand

Beispiel 3

Messung der Quervernetzung durch Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (= FCS)

Die FCS ist eine Methode, die auf der Anzahlfluktuations-Spektroskopie beruht. Mit der FCS können Diffusionskoeffizienten und Anzahlkonzentrationen fluoreszierender Moleküle in hochverdünnter Lösung gemessen werden. Die Fig. 1 und 2 zeigen den Aufbau einer FCS-Apparatur und ihr Funktionsprinzip. Dabei wird ein Laserstrahl über ein Mikroskopobjektiv in ein sehr kleines Volumen einer flüssigen Probe fokussiert und die darin angeregte Fluoreszenz gemessen.

Fig. 1 zeigt eine FCS-Apparatur. Der fokussierte Laserstrahl und die konfokalen Blenden definieren ein sehr kleines Beobachtungsvolumen (das konfokale Volumen) in der Probe. Die zeitlichen Schwankungen der Fluoreszenz aus diesem Volumen werden mit einem Korrelator analysiert.

Fig. 2: (= Anzahlfluktuationen im Beobachtungsvolumen führen zu Fluktuationen des FCS-Signals $I(t)$). Aus der Autokorrelationsfunktion $G(t)$ des FCS-Signals können die mittlere Verweilzeit τ (= mittlere Zeit für die Diffusion eines Teilchens durch das Beobachtungsvolumen) und die Zahl der Moleküle N im Meßvolumen abgelesen werden. τ ist direkt proportional zur Größe der fluoreszierenden Moleküle.

Das Volumen ist dabei so klein, daß sich darin im Mittel nur wenige Teilchen befinden. Die Teilchenzahl im Volumen schwankt durch Diffusion ständig um einen mittleren Wert N . Damit schwankt auch die Fluoreszenzintensität $I(t)$ um einen mittleren Wert I_m . Aus den Schwankungen der Fluoreszenz lassen sich die Diffusionszeit τ (proportional zur Molekülgröße) und die Anzahlkonzentration der fluoreszierenden Moleküle berechnet (siehe Fig. 1).

Bestimmung der Molekulargewichte durch Gel-Permeations-Chromatographie (GPC)

Die Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung (MGV) erfolgte mittels GPC. Die wichtigsten Versuchsparameter:

Säule: TSK Gel, 4000 SWXL, 250 · 4 mm
Laufmittel: 0,01 M NaH_2PO_4 , 0,1 M Na_2SO_4 , 1% SDS
pH: 5,3
Temperatur: 30°C
Fluß: 0,5 ml/min
Detektion: UV-Spektrometer, 220 nm

Zur Probenvorbereitung wurden jeweils ca. 0,5 g Substanz in 100 ml Laufmittel für 15 min bei $T = 60^\circ\text{C}$ gerührt. Die so erhaltene trübe Lösung wurde durch einen 0,2 μm -Filter filtriert und anschließend in die Probenschleife des GPC-45erätes injiziert (ca. 20 μl). Nicht wasserlösliche Gelatine-Bestandteile konnten nicht detektiert werden.

Als direkte Meßgröße erhielt man bei dieser Methode das Intensitätssignal des Detektors (Maß für die Konzentration) als Funktion der Elutionszeit. Bei der GPC wurden die Moleküle nach ihrem hydrodynamischen Radius r_H getrennt. Moleküle mit großem r_H werden dabei schneller eluiert als Moleküle mit kleinem r_H .

Über eine Kalibrierung mit Standard-Polymeren (hier: Pullulstandards) konnte aus den Elutionsdiagrammen MGV berechnet werden [siehe M. D. Lechner, K. Gehrke und E. H. Nordmeier, in: "Makromolekulare Chemie", Kapitel 4.3.6.1., Birkhäuser Verlag (1996)]. Zwischen der Elutionszeit t_E und der Molmasse M der Pullulstandards gilt in erster Näherung folgende Proportionalität:

$$t_E \propto \log(M) \quad (1)$$

Exakter lassen sich bei einer Auftragung von t_E vs. $\log(M)$ die Daten jedoch mit einem Polynom dritten Grades beschreiben. Aus der Inversen dieses Polynoms können aus den Gelatine-Elutionszeiten Gelatine-Molekulargewichte berechnet werden. Die so erhaltenen Molekulargewichte sind somit keine absoluten Gelatine-Molekulargewichte (wie sie z. B. aus der LS erhalten werden können), sondern lediglich relative Molekulargewichte (bezogen auf die hier verwendeten Standards). Weiterhin ist zu beachten, daß aufgrund der zur Verfügung stehenden Pullulstandards die Diagramme nur im Bereich von 12 min < t < 25 min ($\approx 10^3$ g/mol < MG < 10^7 g/mol) sinnvoll in die entsprechenden Molekulargewichte umgerechnet werden können. Annähernd [siehe Gleichung (1)] ist bei einer halblogarithmischen Auftragung (t_E vs. $\log(M)$) die Fläche unter der Kurve der untersuchten Substanzmenge proportional. Die Elutionsdiagramme wurden auf gleiche Gesamtflächen normiert, so daß die Flächen unter den Kurven – und somit die jeweiligen Substanzmengen – direkt miteinander verglichen werden konnten.

Folgende Beobachtungen wurden gemacht: Mit zunehmender Dauer der Inkubation der markierten Gelatine mit der unmarkierten Gelatine und der Lysyloxidase wurde der Wert τ (proportional zur Molekülgröße) bei Messungen durch die FCS immer kleiner und gleichzeitig nahm die Intensität (I , keps) der Fluoreszenz ab (Tabelle 1, Fig. 3).

Weiterhin wurde in der GPC, mit zunehmender Inkubationszeit eine Abnahme der hochmolekularen Gelatine-Anteile beobachtet (Tabelle 2, Fig. 4).

Durch die Inkubation der Gelatine mit Lysyloxidase wurde die Gelatine vernetzt. Diese vernetzten Anteile konnten in Wasser nicht mehr vollständig gelöst werden, sondern lagen als gequollene Gelpartikel vor. Bei der FCS- und GPC-Präparationsanordnung wurden diese Partikel durch Zentrifugation oder Filtration abgetrennt und konnten nicht mehr detektiert werden.

Mit zunehmender Inkubationszeit der Gelatine verschwanden bevorzugt die hochmolekularen Gelatine-Anteile aus dem Eluogramm. Dies bedeutet, daß gerade die hochmolekularen Gelatine-Anteile überproportional von der Vernetzung betroffen sind. Aus statistischen Gründen ist dieses Verhalten durchaus sinnvoll. Darüberhinaus konnte aber auch eine molekulargewichtsabhängige Verteilung der Lysingruppen für diesen Befund mit verantwortlich sein.

Die Abnahme von τ durch FCS-Messungen ist als Abnahme des Molekulargewichts zu interpretieren und konnte durch Gel-Vernetzungs-Chromatographie direkt gezeigt werden. Die Abnahme der Intensität ist auf die Abnahme der Anzahl fluoreszenter Teilchen im Überschuß der rückgelassenen Präparate zurückzuführen. Durch Quervernetzung wurden große Gelatinemoleküle mit höherer Wahrscheinlichkeit betroffen als kleine Moleküle. Außerdem können kleine Moleküle, das durch die Wirkung der Lysyloxidase entstandene Netzwerk besser verlassen als unvernetzte, große Gelatinemoleküle, die im unlöslichen Teil zurückbleiben.

Damit konnte gezeigt werden, daß durch die Lysyloxidase eine für eine Quervernetzung ausreichende Zahl von Allylsinen und später Schlüßfische Basen gebildet werden.

Beispiel 4

Nachweis der Quervernetzung durch einen schnellen, parallelisierbaren Test in Mikrotiterplatten

Gelatine wurde mit 1 mM N-Hydroxysuccinimid aktiviertem Biotin bei pH 8,4 in einem Boratpuffer markiert und anschließend gegen einen 20 mM Phosphatpuffer pH 7,4 mehrfach dialysiert. Die Fähigkeit der so modifizierten Gelatine, Avidin oder Streptavidin zu binden, konnte in Vorversuchen gezeigt werden. 10 und 100 µg/ml Gelatine binden nach Biotin-Modifikation an die mit Avidin modifizierte Oberfläche eines Bioscove-Sensorschips. Nicht modifizierte Gelatine wurde nicht an diese Oberfläche gebunden.

Testprinzip und Durchführung

Gelatine wurde an die Oberfläche von Mikrotiterplatten adsorbiert. Danach wurde Biotin-markierte Gelatine und die quervernetzende Substanz/Enzym zugefügt. Adsorbierte Gelatine wurde mit biotinylierter Gelatine vernetzt. Nach einer intensiven Waschschrift wurde die Biotinylierung durch einen Streptavidin-Peroxidase-Komplex nachgewiesen.

0,4 ml einer 1%igen Gelatinelösung in 0,1 M NaHCO₃, pH 9,2 wurde für 3 Stunden bei Raumtemperatur an NUNC MaxiSorp Elispates adsorbiert. Danach wurde dreimal mit PBS, 0,05% Tween 20 Lösung gewaschen.

Danach wurde biotinylierte Gelatine und in verschiedenen Konzentrationen Quervernetzer zugegeben. Dies wurde in einem PBS Puffer mit 5 mM DTT und 0,1% Tween 20 durchgeführt. Die Mikrotiterplatten wurden anschließend für verschiedene Zeiten bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Danach wurden die Platte 6 mal gewaschen, um nicht-angesetztes Material zu entfernen.

Zum Nachweis wurde Streptavidin-Peroxidase der Firma Boehringer 1 : 10 000 in PBS, 0,1% Tween 20 verdünnt und 1 ml pro Well zugegeben. Es wurde erneut 30 Minuten bei Raumtemperatur (ca. 23°C) inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden 0,015 ml Reaktionsgemisch (0,1 ml 42 mM Tetraethylbenzidin in DMSO, 10 ml 0,1 M Natriumacetat, pH 4,9 mit Zitronensäure eingestellt) zugegeben. Es bildete sich eine blaue Farblösung im Laufe der Reaktion. Die Reaktion wurde nach 5 Minuten mit 0,1 ml 2 M Schwefelsäure gestoppt. Die blaue Farbe wurde dabei gelb. Anschließend erfolgte die Messung der Absorption bei 450 nm.

Beispiel 5

Rreinigung der Lysyloxidase

Homogenisation

Die Zellen von *Pichia pastoris* (ca. 18 ml) wurden nach Lagerung bei -20 Grad C aufgetaut und mit Puffer A (20 mM Natriumphosphat, 1 mM Ethanolamin, pH 7,0 auf 50 ml verdünnt. Es wurden 50 ml Gasperlen, Durchmesser 0,5 mm, zugegeben und 30 Minuten bei 5000 U/min unter Kühlung durch Eis homogenisiert. Das Homogenat wurde über Gaze filtriert. Das Filtrat wurde 10 Minuten bei 8000 rpm und 4 Grad C zentrifugiert.

Ionen austauschchromatographie

Der Überstand wurde mit NaOH auf pH 7,0 erneut eingestellt und auf eine Q-Sepharose aufgetragen (Q-Sepharose Fast Flow, Pharmacia, Durchmesser 5 cm, Höhe 13 cm, Volumen 250 ml). Nach dem Auftrag (Leitfähigkeit 0,7 mS/cm, 540 ml) wurde mit 600 ml Puffer A gewaschen. Die Säule wurde mit einem linearem Gradient von 1 l Puffer A und 1 l Puffer B (wie Puffer A mit 1 M NaCl) eluiert. Die aktiven Fraktionen wurden gesammelt.

Molekularsiebchromatographie

Die Wertfraktion wurde nach Konzentrierung über einen 10 kDa-Omega-Filter auf einer präparativen Superdex Säule (Pharmacia, Durchmesser 2,6 cm, Länge 60 cm Volumen 320 ml) in 20 mM Natriumphosphatpuffer, 150 mM NaCl, 1 mM Ethanolamin, pH 7,5 getrennt. Die aktiven Fraktionen wurden gesammelt.

Ionenaustauschromatographie

Die Wertfraktion der Molekularsiebchromatographie wurde erneut durch Chromatographie an einer Mono-Q-Säule gereinigt (Pharmacia, HR5/S). Der Gradient wurde aus Puffer A und Puffer B erzeugt. Flußgeschwindigkeit 1 ml/Minut, 100 Fraktionen zu je 1 ml. Die Lysyloxidase eluierte als aktives Hauptprotein. Das Protein hatte im SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen ein Molekulargewicht von ca. 121 000 Da.

Folgende Sequenzen wurden erhalten:

Aminoterminal Sequenz

G(S)(C)Q(C)KTNBKVNEAPKPN(C)DT(I)(S)

Sequenzen, die Peptiden des Proteins entsprechen, die nach einem Verdau mit Trypsin erhalten wurden:

EYPCAPGVVYNTK

GGTYSTVQNPILNR

DYNIMPGGXVIR

ATGGTYSTVXAQN

APETENNAR

GPLPjVNE(E)TTTEPLSFYNT

IYFLSIQELIAEYGSDDPNNQHIFYSID

DNVDDLSCITIQR

VAPEENCAR

NVDVFPYCAPGVVYNTK

GYPNAEY(S)LDIYIR

Tabelle 1

| Manuelle Messungen | | | | | | |
|--------------------|--------|-------|-------|-----|--------------|---------|
| lfd. Nr. | Zeit | Sek. | Beta | N | Tau, μ s | I, kcps |
| 66 | 0h | 61348 | 0,190 | 5,3 | 456,2 | 220,9 |
| 67 | | 61414 | 0,204 | 4,9 | 452,9 | 211,3 |
| 68 | | 61480 | 0,210 | 4,8 | 441,6 | 206,4 |
| 69 | 0h | 61562 | 0,172 | 5,8 | 455,8 | 240,3 |
| 70 | | 61628 | 0,180 | 5,6 | 450,3 | 230,1 |
| 71 | | 61696 | 0,186 | 5,4 | 456,5 | 226,6 |
| 72 | 2h | 61780 | 0,262 | 3,8 | 469,2 | 164,0 |
| 73 | | 61846 | 0,282 | 3,5 | 468,4 | 155,3 |
| 74 | | 61912 | 0,288 | 3,5 | 463,0 | 152,2 |
| 75 | 2h | 62074 | 0,314 | 3,2 | 477,0 | 139,7 |
| 76 | | 62140 | 0,335 | 3,0 | 474,6 | 133,8 |
| 77 | | 62206 | 0,338 | 3,0 | 469,6 | 129,1 |
| 78 | 24h | 62354 | 0,295 | 3,4 | 345,2 | 153,4 |
| 79 | | 62420 | 0,309 | 3,2 | 358,3 | 147,8 |
| 80 | | 62486 | 0,315 | 3,2 | 346,9 | 145,6 |
| 81 | 24h | 62588 | 0,281 | 3,6 | 361,3 | 159,1 |
| 82 | | 62654 | 0,288 | 3,5 | 353,1 | 153,8 |
| 83 | | 62720 | 0,292 | 3,4 | 358,0 | 153,3 |
| 84 | 29h | 62840 | 0,324 | 3,1 | 337,0 | 138,8 |
| 85 | | 62906 | 0,335 | 3,0 | 339,7 | 133,1 |
| 86 | | 62972 | 0,340 | 2,9 | 338,0 | 131,7 |
| 87 | 29h | 63124 | 0,294 | 3,4 | 356,0 | 151,6 |
| 88 | | 63190 | 0,314 | 3,2 | 347,4 | 141,9 |
| 89 | | 63256 | 0,325 | 3,1 | 345,1 | 139,5 |
| 90 | 48h | 63334 | 0,559 | 1,8 | 288,2 | 84,7 |
| 91 | | 63400 | 0,574 | 1,7 | 292,5 | 83,6 |
| 92 | | 63466 | 0,570 | 1,8 | 288,1 | 83,9 |
| 93 | 48h | 63544 | 0,441 | 2,3 | 292,8 | 104,4 |
| 94 | | 63610 | 0,458 | 2,2 | 299,6 | 102,1 |
| 95 | | 63676 | 0,460 | 2,2 | 296,5 | 100,2 |
| 96 | Bodypy | 63750 | 4,292 | 0,2 | 99,5 | 9,5 |
| 97 | | 63816 | 4,669 | 0,2 | 98,5 | 8,9 |
| 98 | | 63882 | 4,582 | 0,2 | 102,1 | 8,8 |

Tabelle 2

| Zeit | Probenbezeichnung | Mn [g/mol] | Nw [g/mol] | Polyd. (D) |
|------|-------------------|------------|------------|------------|
| 0 h | 63/192-1 | 35000 | 149000 | 4,26 |
| 2 h | 63/192-2 | 35000 | 145000 | 4,13 |
| 24 h | 63/192-4 | 21000 | 39000 | 1,86 |
| 29 h | 63/192-5 | 20000 | 35000 | 1,76 |
| 48 h | 63/192-6 | 17000 | 28000 | 1,66 |

Patentansprüche

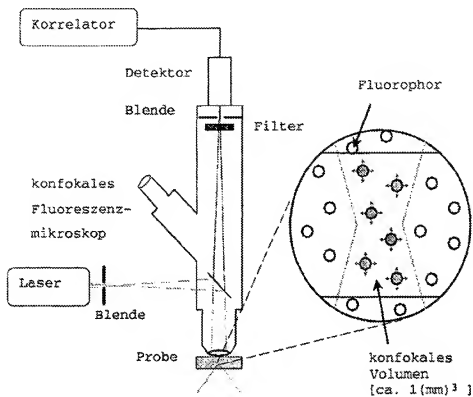
1. Verfahren zur Herstellung von Wirkstoffzubereitungen, in denen ein oder mehrere Wirkstoffe von mindestens einer Schicht umgeben sind, **dadurch gekennzeichnet**, daß mindestens eine der den oder die Wirkstoffe umgebenden

Schichten oder Teile dieser Schichten aus einem Protein bestehen, das mit einem Enzym ausgewählt aus der Gruppe der Lipoxigenasen, Proteindisulfidomerasen, Phenoloxidasen und Peroxidasen, Lysyloxidasen, Proteindisulfidreduktasen, Tyrosinoxidasen oder Sulfhydryloxidasen quervernetzt wurde.

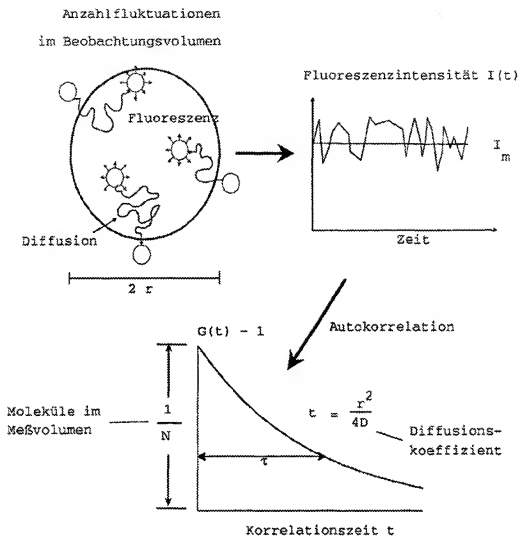
2. Verfahren zur Herstellung von Wirkstoffzubereitungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der oder die Wirkstoffe oder ein oder mehrere mit mindestens einer Schicht umgebende Wirkstoffe in Lösung mit vernetzbarem Protein und Enzym zur Beschichtung gemischt wird, wobei das Gewichtsverhältnis zwischen Wirkstoff und Protein zwischen 1 zu 100 und 5 zu 1 liegt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirkstoff Vitamine, Enzyme, Lebensmittelzusatzstoffe oder Futtermittelzusatzstoffe verwendet werden.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff hydrophob ist.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß ein vernetzbares Protein ausgewählt aus der Gruppe Gelatine, Kasein, Sojaprotein, Weizenprotein, Maisprotein oder Kollagen verwendet wird.
6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß ein aus Mikroorganismen gewonnenes Enzym verwendet wird.
7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Quervernetzung mit dem Enzym Lysyloxidase durchgeführt wird.
8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens einen Wirkstoff mit einer wäßrigen Lösung aus vernetzbarem Protein und Enzym durchmischt und versprüht.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß in einer mit hydrophober Kieselsäure, Maisstärke oder hydrophobisierte Maisstärke beladenen Atmosphäre versprüht wird.
10. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Wirkstoffzubereitung bis zu einer Restfeuchte unter 10 Gew.-% getrocknet wird.
11. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Temperatur bei der Herstellung der Wirkstoffzubereitung im Wesentlichen unter 80°C gehalten wird.
12. Wirkstoffzubereitung erhältlich nach einem Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 11.
13. Wirkstoffzubereitung enthaltend mindestens eine einen oder mehrere Wirkstoffe umgebende Schicht oder Teile einer Schicht aus einem Protein, das mit einem Enzym ausgewählt aus der Gruppe der Lipoxigenasen, Proteindisulfidomerasen, Phenoloxidasen und Peroxidasen, Lysyloxidasen, Proteindisulfidreduktasen, Tyrosinoxidasen oder Sulfhydryloxidasen quervernetzt wurde.
14. Wirkstoffzubereitung nach Anspruch 13, wobei die Wirkstoffe ausgewählt sind aus der Gruppe:
Carotinoide
Xanthophylle
Vitamin A
Vitamin B
Vitamin D₃
Vitamin K,
15. Wirkstoffzubereitung nach Anspruch 13 oder 14, die den 0,025-fachen bis 4-fachen Gewichtsanteil bezüglich Wirkstoff an Trennmittel oder Trennmittelgemischen enthält.
16. Wirkstoffzubereitung nach den Ansprüchen 13 bis 15, wobei der Wirkstoffgehalt in der Wirkstoffzubereitung zwischen 1 bis 75 Gew.-% liegt.
17. Ein isoliertes Protein, das mindestens eine der folgenden Aminosäuresequenzen enthält
G(S)(C)Q(C)K(T)N(E)K(V)N(E)A(P)K(P)N(C)D(T)(L)(S)
E(Y)P(C)A(P)G(V)Y(V)N(T)K
G(K)T(Y)S(T)Y(T)Q(N)F(T)L(N)R
D(Y)N(I)M(P)G(G)X(V)H(R)
A(T)G(T)Y(S)T(V)X(X)A(Q)N
A(P)E(T)E(N)N(A)R
G(P)L(P)A(V)N(E)(E)(T)T(E)P(L)S(F)Y(N)T
I(Y)E(L)S(T)Q(E)L(A)E(Y)G(S)D(P)N(N)Q(H)I(T)Y(S)D(I)
D(N)V(D)D(L)S(C)T(Q)R
V(A)P(E)T(E)N(C)A(R)
N(V)D(V)E(Y)P(C)A(P)G(V)Y(V)N(T)K
G(Y)P(A)E(Y)(S)L(D)F(E)R
und das die ε-Aminogruppen des Lysins zu Aldehydgruppen oxidieren kann.
18. Verwendung eines Enzyms ausgewählt aus der Gruppe der Lipoxigenasen, Proteindisulfidomerasen, Phenoloxidasen und Peroxidasen, Lysyloxidasen, Proteindisulfidreduktasen, Tyrosinoxidasen oder Sulfhydryloxidasen zur Formulierung von Wirkstoffzubereitungen.
19. Lebensmittel oder Futtermittel, enthaltend eine Wirkstoffzubereitung nach den Ansprüchen 13 bis 16.
20. Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend eine Wirkstoffzubereitung nach den Ansprüchen 13 bis 16.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

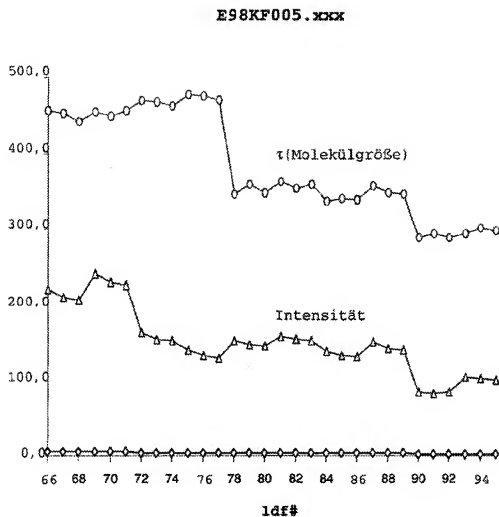
Figur 1: Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (= FCS)



Figur 2



Figur 3



Figur 4

Fläche norm. [a.u.]

